

拟南芥细胞壁关联蛋白激酶融合表达及多克隆抗体的制备

李少琼¹ 徐朗莱¹ 陈伟华² 谢静红¹ 凌永贞¹ 杨志敏^{1,*}

南京农业大学¹生命科学学院, ²动物医学院, 南京210095

Fusion Expression of Cell Wall-associated Kinase 1 and Its Polyclonal Antibody Preparation of *Arabidopsis thaliana*

LI Shao-Qiong¹, XU Lang-Lai¹, CHEN Wei-Hua², XIE Jing-Hong¹, LING Yong-Zhen¹, YANG Zhi-Min^{1,*}

¹College of Life Science, ²College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

提要 为了研究拟南芥中细胞壁关联蛋白激酶1 (WAK1)基因功能, 通过RT-PCR得到 WAK1 cDNA 片段, 将其亚克隆至 pET28a 表达载体中进行表达, 获得融合蛋白。用纯化的融合蛋白 pET28a WAK1 免疫家兔, 得到抗 WAK1 抗体。Western blot 结果显示该抗体能特异识别在原核表达系统内表达的抗原, 抗 WAK1 的抗体对拟南芥中的 WAK1 蛋白具有高度的特异性。
关键词 WAK1 基因; 拟南芥; 原核表达; 多克隆抗体

细胞壁关联蛋白激酶(cell wall-associated kinase, WAK)是近年来新发现的一种类受体蛋白激酶^[1,2]。已知在拟南芥细胞中被鉴定的 WAK 胞质外结构域具有类似于哺乳动物表皮生长因子的重复序列, 它们能与细胞壁内果胶组分紧密结合^[3]。WAK 分子除上述特征结构外, 还含有一个与细胞质膜连接的跨膜区, 以及定位于胞质内一个 Ser/Thr 激酶活性的结构域^[4]。此外, 有报道认为, WAK 蛋白结构域在细胞壁中还能与一组富含甘氨酸残基的蛋白质相结合, 后者能启动胞质内其它蛋白激酶的活性^[5]。因此, WAK 分子的这种结构与受体蛋白激酶很相似。

目前, 在拟南芥中被鉴定出来的 WAK 基因有 5 个成员 (*WAK 1~5*)^[3,6~8]。此外, 还有 21 个成员的基因结构类似于 *WAK* 家族, 因此被称为 *WAK-like* (*WAKL*) 基因^[5]。研究表明, WAK 主要参与根的伸长和形态发生^[9], *WAK* 基因参与植物对病原菌和机械伤害的反应^[7]。同时还发现, *WAK1* 表达能保护植物遭受由病原菌生物胁迫诱导的高水平内源水杨酸所引起的伤害, 表明它是一个病程相关基因。最近, Sivaguru 等^[5]发现在拟南芥中, *WAK1* 基因表达可以被铝胁迫所诱导。我们在拟南芥中也发现 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Cu}^{2+}$ 能迅速诱导根系 WAK1 mRNA 和蛋白质的大量表达, 表明 WAK1 能介导从胞外到细胞质的信号转导。由于 WAK 及相关基因是一个新发现的蛋白质和基因家族, 迄今为止, 人们对 WAK 蛋白的结构和功能

及相关基因特性还缺乏足够的了解^[5]。为了深入研究其功能, 我们将 *WAK1* 基因片段在大肠杆菌中进行了表达, 表达蛋白经电泳纯化后作为抗原免疫新西兰白兔, 制备出了相应的多克隆抗体。这些结果可供进一步研究 *WAK* 和相关基因的功能时参考。

材料与amp;方法

1 试剂和材料

大肠杆菌 DH5 α 、BL21 (DE3) 和质粒 pET28a 由本实验室保存。Trizol 购自 Invitrogen, 限制性内切酶购自 Takara 公司, 反转录酶购自 Promega 公司, T₄ DNA 连接酶购自 Takara 公司, HRP 标记的羊抗兔二抗购自南京生兴公司。实验动物——雄性新西兰家兔购自江苏省农业科学院。

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 种子经 0.5% NaClO 消毒后, 用去离子水洗净, 漂浮在 1/4 强度的改良 Hoagland 营养液塑料网上催芽生长。培养条件为: 温度 (24 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$, 光照强度 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 14 h $\cdot\text{d}^{-1}$ 光照周期。30 d 后, 收获叶片, 液氮速冻, 于 -80°C 中冰箱中贮存备用。

2 引物的设计与合成

根据 GenBank 收录的 *WAK1* 基因核苷酸序列,

收稿 2005-01-11 修定 2005-04-07

资助 国家自然科学基金 (30070447)。

*通讯作者 (E-mail: zmyang@njau.edu.cn, Tel: 025-84395057)。

设计1对引物: P₁, 5' GGTGGTGAATTCGATCTTC-TGAATCTGCGAAATGTCATGAGGTTCC 3'; P₂, 5' GGTGGTCTCGAGTATTTGTAGCGAGAAAAGCA-AATTGTTGGGACAC 3'。引物由大连宝生物工程有限公司合成。

3 WAK1 基因的 RT-PCR 扩增

用Trizol试剂提取拟南芥叶片RNA(方法参照产品说明书)。反转录总反应体系为25 μL, 取11.3 μL DEPC处理的去离子水、1 μL RNA (2 μg·μL⁻¹), 加入1 μL Oligo(dT) (0.5 μg·μL⁻¹), 置于70℃加热5 min, 立即冰浴5 min, 加入5 μL 5×缓冲液、dNTP (2.5 mmol·L⁻¹) 5 μL、RNasin (40 U·μL⁻¹) 0.7 μL、M-MLV (200 U·μL⁻¹) 1 μL, 混匀, 置37℃下60 min, 95℃作用5 min灭活反转录酶, 冰浴5 min。以上述反转录产物为模板进行PCR。PCR反应条件为: 95℃ 2 min; 94℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 2 min, 循环扩增25次; 最后72℃延伸5 min。扩增产物于1%琼脂糖凝胶进行电泳分析。

4 重组质粒的构建和鉴定

RT-PCR产物经EcoRI和XhoI双酶切, 产物经琼脂糖凝胶电泳后割胶纯化, 与经同样酶切的pET28a载体连接, 构建重组质粒。连接产物转化入大肠杆菌DH5α, 挑取阳性克隆, 提取质粒并测序鉴定。

5 融合蛋白的原核表达和包涵体的获得

重组质粒转入大肠杆菌BL21 (DE3)中, 37℃过夜培养。次日, 以1:100的体积比接种至1 L含卡那霉素(终浓度为50 μg·mL⁻¹)的新鲜LB液体培养基中, 37℃振荡培养至OD₆₀₀约为0.6, 加IPTG至终浓度为0.1 mmol·L⁻¹, 继续在37℃下诱导表达3 h, 离心收集菌体。菌体重悬于缓冲液A (50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 含100 mmol·L⁻¹ NaCl、0.5% TritonX-100, pH 8.0)中, 超声裂解细菌, 离心收集包涵体, 缓冲液A洗涤3次后用1% SDS溶解包涵体。

6 动物免疫及抗血清的制备

溶解的包涵体进行SDS-PAGE电泳(分离胶浓度为12.5%), 考马斯亮蓝染色、脱色后, 割取重组WAK1蛋白条带(蛋白含量为1 mg), 碾碎, 与1 mL弗氏完全佐剂混匀, 按常规程序免疫家

兔, 共免疫4次。心脏取血, 4℃析出血清, 分离血清, 加0.02%叠氮钠, 于-20℃中保存。

7 Western印迹

含不同质粒的BL21 (DE3)细菌过夜振荡培养后, 以1:100的体积比接种于新鲜液体培养基中继续振荡培养, 至细菌的OD₆₀₀值为0.6, 加IPTG诱导表达3 h后, 取50 mL菌液离心, 沉淀溶于等体积1×上样缓冲液(SDS loading Buffer), 煮沸5 min, 各管蛋白质等体积上样进行SDS-PAGE(分离胶浓度为12.5%)。5 mA·cm⁻²(膜)恒流0.5 h, 将蛋白转至硝酸纤维素膜上, 在封闭液(含3%脱脂奶粉的TBS)中4℃封闭过夜, 用含0.05% Tween-20的TBS洗膜4次, 每次10 min。以1:5 000的比例加入一抗, 30℃孵育1 h, 用含0.05% Tween-20的TBS洗膜4次, 每次10 min。以1:300的比例加入带有HRP标记的羊抗兔的二抗, 30℃孵育1 h, 用含0.05% Tween-20的TBS洗膜4次, 每次10 min, 加TMB显色。

实验结果

1 原核表达载体的构建

RT-PCR得到的WAK1 cDNA片段为1.14 kb(图1)。双酶切后连入pET28a载体。经双向测序鉴定, 构建的载体pET28a WAK1的阅读框正确。WAK1序列与GenBank上WAK1 mRNA序列同源性达99.5%(数据未列出)。

2 融合蛋白的诱导表达与纯化

将pET28a WAK1重组质粒转至大肠杆菌BL21 (DE3)中, 经IPTG诱导后收获菌体, 破细菌得到包涵体。对包涵体样品进行SDS-PAGE, 结果如图2所示。与转化有空载体pET28a的大肠杆菌BL21相比, 含有重组质粒pET28a WAK1的

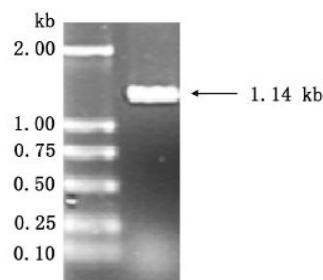


图1 通过RT-PCR获得的WAK1 cDNA部分片段

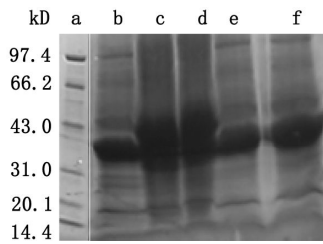


图2 融合蛋白的原核表达与纯化

a: 标准蛋白; b: 转化有重组质粒 pET28a WAK1 的大肠杆菌 BL21 (DE3) 未经 IPTG 诱导表达的包涵体; c: 转化有重组质粒 pET28a WAK1 的大肠杆菌 BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导 3 h 后表达的包涵体; d: 转化有重组质粒 pET28a WAK1 的大肠杆菌 BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导 6 h 后表达的包涵体; e: 转化有空载质粒 pET28a 的大肠杆菌 BL21 (DE3) 未经 IPTG 诱导表达的包涵体; f: 转化有空载质粒 pET28a 的大肠杆菌 BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导 6 h 后表达的包涵体。

大肠杆菌 BL21 (DE3) 经诱导后产生大量 43 kD 融合表达产物, 大小与预期的分子量相符。

3 抗体的特异性分析

从凝胶上切割与预期分子量相符的诱导表达蛋白带, 免疫兔子, 得到多克隆抗血清, 抗血清效价为 1:16。Western 印迹在原核表达体系中的检测结果显示: 以诱导空载 pET28a 质粒表达产物作为对照的泳道未见条带(图3), 而含有诱导重组质粒表达产物的泳道可见特异条带, 表明该抗体在原核体系中具有较高的特异性。

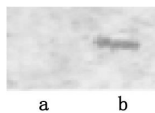


图3 Western 印迹法检测抗 WAK1 抗体在原核表达体系中的特异性

a: 转化有空载质粒 pET28a 的大肠杆菌 BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导后的表达结果; b: 转化有重组质粒 pET28a WAK1 的大肠杆菌 BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导后表达结果。

讨 论

在过去 20 年中, 采用各种载体系统在大肠杆菌中已经表达了数百种重组蛋白, 尤其是用表达的重组蛋白免疫动物来制备抗体已成为一种行之有效的办法。本文用的是膜蛋白, 含量少, 且不易纯化, 因此采用大肠杆菌表达 WAK1 重组蛋白来制备抗体是一条切实可行的方案。

He 等^[3]报道了用 pGEX 表达系统来表达 WAK

融合蛋白, 但没有发表详细的抗体制备过程。pGEX 表达系统是一种融合有谷胱甘肽转移酶 (GST) 标签的原核表达系统, 融合蛋白中的 GST 部分需通过蛋白酶切除, 经诱导表达的融合蛋白需用亲和层析法纯化, 步骤较为复杂, 费用较高。本文详细报道了用 pET 表达系统, 异源表达 WAK1。在这一系统中, 重组蛋白主要以包涵体形式存在, 经多次洗涤后重组蛋白占包涵体的 80%, 甚至 90% 以上。在抗体制备过程中用制备 SDS-PAGE 来纯化重组 WAK1 蛋白, 避免了包涵体的变性和复性过程, 得到纯度很高的重组蛋白, 直接切割凝胶作为抗原, 1 次电泳得到大量的蛋白即可满足免疫兔子的需要。此法可靠、简便又经济。

本文成功地制备了特异性较高的 WAK1 多克隆抗体, 可用于 Western 印迹分析和免疫细胞化学研究, 为今后 WAK1 的表达和分布检测以及与其它蛋白质相互作用等研究工作的开展奠定了基础。

参考文献

- Kohorn BD. Plasma membrane-cell wall contacts. *Plant Physiol*, 2000, 124: 31~38
- Wagner TA, Kohorn BD. Wall-associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion. *Plant Cell*, 2001, 13: 303~318
- He ZH, Fujiki M, Kohorn BD. A cell wall-associated receptor-like protein kinase. *J Biol Chem*, 1996, 271: 19789~19793
- Anderson CM, Wagner TA, Perret M et al. WAKS: cell wall associated linking the cytoplasm to the extracellular matrix. *Plant Mol Biol*, 2001, 47: 197~206
- Sivaguru M, Ezaki B, He ZH et al. Aluminum-induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2003, 132: 2256~2266
- He ZH, He D, Kohorn BD. Requirement for the induced expression of a cell wall associated receptor kinase for survival during the pathogen response. *Plant J*, 1998, 14: 55~63
- He ZH, Cheesman I, He D et al. A cluster of five cell wall-associated receptor kinase genes, WAK1-5, are expressed in specific organs of *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 1999, 39: 1189~1196
- Verica JA, He ZH. The cell wall-associated kinase (WAK) and WAK-like kinase gene family. *Plant Physiol*, 2002, 129: 455~459
- Lally D, Ingmire P, Yong HY et al. Antisense expression of a cell wall-associated protein kinase, WAK4, inhibits cell elongation and alters morphology. *Plant Cell*, 2001, 13: 1317~1331